

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
1 juillet 2004 (01.07.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2004/055174 A1**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : C12N 5/06

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2003/003691

(22) Date de dépôt international :  
12 décembre 2003 (12.12.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
02/15827 13 décembre 2002 (13.12.2002) FR

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) : CEL-  
OGOS [FR/FR]; 28, rue du Docteur Roux, F-75724 Paris  
(FR).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (*pour US seulement*) : PINSET,  
Christian [FR/FR]; 2, rue de Doudeauville, F-75018  
PARIS (FR).

(74) Mandataires : POCHART, François etc.; Cabinet  
Hirsch-Pochart, 34, rue de Bassano, F-75008 Paris (FR).

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,

CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,  
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,  
MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,  
RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR,  
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (BW, GH, GM,  
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,  
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,  
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— *relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US  
seulement*

Publiée :

— *avec rapport de recherche internationale*  
— *avant l'expiration du délai prévu pour la modification des  
revendications, sera republiée si des modifications sont re-  
çues*

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.*

(54) Title: CULTURE MEDIUM COMPOSITION, CULTURE METHOD, AND MYOBLASTS OBTAINED, AND THEIR USES

(54) Titre : COMPOSITION DE MILIEU DE CULTURE, PROCÉDE DE CULTURE, ET MYOBLASTES AINSI OBTENUS, ET  
LEURS UTILISATIONS

(57) Abstract: The invention concerns a composition of culture medium of progenitor/stem cells derived from muscular tissues containing serum and/or serum fraction of human origin and/or of animal origin of insulin or a derivative thereof, and one or several compound(s) selected among the class of antioxidants and/or of vitamins. The invention also concerns a method for culturing progenitor/stem cells, a method for producing myoblasts capable of being used as cellular/genetic therapy product. The invention aims at optimizing the production of myoblasts from progenitor/stem cells.

(57) Abrégé : La présente invention se rapporte à une composition de milieu de culture de cellules progénitrices/souches issues de tissus musculaires contenant du sérum et/ou de la fraction sérique d'origine humaine et/ou d'origine animale de l'insuline ou un dérivé de celle-ci, et un ou plusieurs composé(s) choisi(s) parmi la classe des antioxydants et/ou des vitamines. Elle propose également un procédé de culture des cellules progénitrices/souches, un procédé de production de myoblastes pouvant être utilisés comme produit de thérapie cellulaire/génique. Cette invention a pour objectif d'optimiser la production en myoblastes à partir de cellules progénitrices/souches.

BEST AVAILABLE COPY

COMPOSITION DE MILIEU DE CULTURE, PROCEDE DE CULTURE,  
ET MYOBLASTES AINSI OBTENUS, ET LEURS UTILISATIONS

La présente invention se rapporte à une composition de milieu de culture de cellules  
5 progénitrices/souches issues de tissus musculaires, à un procédé de culture des cellules  
progénitrices/souches, et à un procédé de production de myoblastes pouvant être utilisés  
comme produit de thérapie cellulaire/génique.

De nombreuses études portant sur des procédés de culture cellulaires ont été réalisées  
dans le but d'obtenir des fractions cellulaires riches en myoblastes afin d'être administrées à  
10 des patients souffrant généralement de dégénérescence musculaire telle que la dystrophie  
musculaire de Duchenne par exemple. Beaucoup d'entre elles ont porté sur le choix des  
cellules initiales, conditions de culture, ou sur l'étape d'identification cellulaire par exemple.

A cet égard, on peut citer le document US-A-5538722 qui propose un procédé de  
synthèse *in vivo* d'une protéine musculaire qui résulte de l'intégration d'un ADN dans les  
15 myoblastes en culture, ces myoblastes ayant subi au moins 5 doublements cellulaires.

Le document US-A-5130141 divulgue une méthode d'obtention de cellules  
myogéniques issues de culture mais également des cellules myogéniques qui ont été  
préalablement clonées, ces dernières présentant des avantages sur les premières du fait de leur  
potentiel de développement supérieur.

20 Le document US-A-2001 0034061 divulgue un procédé de culture de cellules  
progénitrices par utilisation contrôlée de culture en hypoxie afin de favoriser une  
différenciation spécifique.

Enfin, le document WO-A-01 94555 se propose de fournir des populations cellulaires  
bien caractérisées d'origine musculaire, adaptées et spécialement préparées pour leur  
25 utilisation souhaitée en thérapie cellulaire.

Cependant, il existe un nombre plus restreint de travaux qui ont été effectués sur la  
composition du milieu de culture lui-même en vue de produire une population cellulaire apte  
à être utilisée en thérapie cellulaire/génique.

Parmi ceux-ci, on trouve la demande européenne EP-A-1048724 qui se rapporte à un  
30 procédé de culture de lignées de cellules musculaires immortalisées c'est à dire qui ont été  
obtenues après un nombre élevé de passages, qui sont utilisées en thérapie génique, soit en  
« réparant » les tissus musculaires défectueux ou comme vecteurs dans lesquelles un ou  
plusieurs gènes peuvent être introduits pour fournir un produit déterminé.

Le document WO-A-97 00774 enseigne un moyen pour améliorer la prise de la greffe  
35 en « préconditionnant » les myoblastes du donneur en présence à la fois d'un facteur de  
croissance tel que bFGF et d'un inducteur de la production de métalloprotéases, pour  
augmenter la distance de migration des myoblastes transplantés et pour accroître le nombre de  
myoblastes fusionnés exprimant des protéines fonctionnelles du muscle.

Le document WO-A-99 56785 divulgue une méthode pour produire des cellules musculaires modifiées génétiquement avant d'être injectées aux sites de dysfonctionnement musculaire : cette méthode étant notamment destinée à traiter l'incontinence urinaire.

Le document WO-A-01 78754 se réfère à des cellules progénitrices ayant une survie *in situ* longue, qui présentent un profil d'expression particulier de marqueurs cellulaires et pouvant être utilisées dans le traitement de l'incontinence urinaire.

Enfin, le document WO-A-02 067867 se rapporte à une méthode de préparation de cellules souches en utilisant une matrice cellulaire pour fixer celles-ci : elle est notamment destinée au traitement urinaire.

La littérature, y compris tous ces documents de l'art antérieur cités ci-dessus, ont ainsi en commun la caractéristique que le sérum animal (non-humain, par exemple bovin ou équin) non supplémenté est utilisé au cours de la culture cellulaire proprement dite, celui-ci étant vraisemblablement considéré comme un apport suffisant de tous les éléments nécessaires à la prolifération cellulaire.

Or, la transplantation exige la production d'un nombre élevé de myoblastes, il est alors important d'améliorer cette production en partant des cellules progénitrices/souches issues de tissus musculaires. La présente invention propose de supplémenter le sérum (ou fraction sérique) qui est utilisé dans le milieu de culture, permettant ainsi d'optimiser le milieu de culture. De ce fait, il est possible de raccourcir le temps de culture. Ainsi cette optimisation permet alors d'utiliser moins de sérum (ou fraction sérique), ce qui est nécessaire dans le cas du sérum humain dont la disponibilité est limitée et du même coup permet de s'affranchir de l'utilisation de protéines animales, sources potentielles de contamination par le prion ou des virus.

Pour résoudre le problème d'optimisation de la production en myoblastes à partir de cellules progénitrices/souches, la présente invention propose une composition de milieu de culture cellulaire contenant :

- (i) du sérum et/ou de la fraction sérique d'origine humaine et/ou d'origine animale
- (ii) de l'insuline ou un dérivé de celle-ci
- (iii) un ou plusieurs composé(s) choisi(s) parmi la classe des antioxydants et/ou des vitamines.

On peut utiliser du sérum et/ou de la fraction sérique d'origine bovine, de préférence d'origine humaine. Avantagusement, la concentration en sérum humain est inférieure à 5 % en volume, et encore davantage entre 1 % et 3 % en volume.

Typiquement, le dérivé de l'insuline est choisi parmi la classe des IGF, et des insulomimétiques de type vanadate.

Avantagusement, la vitamine est l'acide ascorbique, et l'antioxydant est la N-acétylcystéine ou le sélénium.

Dans un mode de réalisation, on peut utiliser en outre un ou plusieurs composé(s) choisi(s) parmi la classe des facteurs de croissance de type FGF. Typiquement, ce facteur de croissance est choisi parmi la classe des bFGF, FGF-2 à FGF-10.

Dans un autre mode de réalisation, le milieu de culture peut comporter le cas échéant un glucocorticoïde.

Dans un autre mode de réalisation, la composition du milieu de culture comprend en outre de l'acide lipophosphatidique et/ou un ou plusieurs composé(s) de la classes des EGF, hérégulines, thrombine, PDGF, hormones thyroïdiennes et LIF.

La présente invention se rapporte également à un procédé de culture de cellules progénitrices et/ou souches, dans lequel on utilise comme milieu de culture durant l'étape d'amplification cellulaire la composition précédemment présentée.

Selon un mode de réalisation, l'étape de différenciation cellulaire est réalisée avant, pendant ou après l'étape d'amplification cellulaire. Typiquement, le sérum humain utilisé est autologue des cellules progénitrices/souches.

L'invention concerne également un procédé de production de myoblastes par mise en œuvre du procédé précédemment présenté.

Selon un mode de réalisation, les cellules progénitrices et/ou souches sont obtenues par une étape d'extraction cellulaire de tissus musculaires. Avantageusement, l'étape d'extraction est réalisée par digestion enzymatique.

Selon un autre mode de réalisation on effectue une récolte et une séparation des cellules obtenues. Typiquement, la récolte et la séparation des cellules est effectuée par digestion enzymatique suivie d'une centrifugation et/ou filtration. L'étape de digestion enzymatique peut en outre être omise.

Selon un autre mode de réalisation, on teste l'aptitude des myoblastes à former des colonies.

Selon un autre mode de réalisation, on effectue une caractérisation cellulaire. Avantageusement, on utilise des marqueurs du cycle cellulaire.

Selon un autre mode de réalisation, on réalise une étape de congélation des myoblastes.

L'invention se rapporte également à une population cellulaire contenant des cellules progénitrices/souches ou des myoblastes ou un mélange de ceux-ci dans le milieu de culture.

Selon l'invention, les myoblastes produits selon le procédé précédemment cité peuvent être utilisés à des fins de thérapie cellulaire. De préférence, ils sont destinés à la préparation d'un produit destiné au traitement de l'incontinence urinaire ou au traitement fonctionnel des petits muscles (une liste non exhaustive de ces muscles caractérisés par leur petite taille comprend les sphincters tel que les sphincters urétraux ou anaux, les muscles des paupières, les muscles des doigts et les muscles du larynx).

Selon un autre mode de réalisation, les myoblastes ainsi produits sont destinés à la thérapie génique.

Enfin, la présente invention se rapporte à l'utilisation des myoblastes produits dans le criblage toxicologique et/ou pharmacologique. Typiquement, ce criblage vise à détecter une ou plusieurs substance(s) impliquée(s) dans la rhabdomyolyse.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront à la lecture de la description qui suit des modes de réalisation de l'invention, donnés à titre d'exemple uniquement et en références aux dessins qui montrent :

- Figure 1: Histogrammes représentant le nombre de noyaux de cellules musculaires humaines par unité de surface en utilisant les milieux de culture : (A) dépourvu de facteurs de croissance ; (B) contenant 5 % de sérum humain selon l'invention ; (C) FGF + insuline + PDGF + EGF + dexaméthasone + thrombine (Mélange M) ; (D) correspondant à (B) + (C), et le milieu « FCS » contenant 20 % de sérum fœtal de veau.
- Figure 2A : Etude de l'effet de la dose de dexaméthasone (concentrations de 0 jusqu'à  $10^{-6}$  M) ajoutée à un milieu de culture contenant du sérum fœtal de veau (FCS) supplémenté par de l'insuline et du FGF sur la prolifération de cellules de rat issues du passage 23.
- Figure 2B : Etude de la spécificité de la dexaméthasone. A un milieu de culture contenant du sérum fœtal de veau (FCS) supplémenté par de l'insuline et du FGF, on observe l'effet de l'ajout de la dexaméthasone à  $10^{-7}$  M, ou d'une autre hormone stéroïdienne (œstradiol, testostérone, progestérone, DEHA, SDEAH, aldostérone) à une dose fixe ( $10^{-7}$  M) sur la croissance cellulaire. La dexaméthasone est également testée ou en association avec l'anti-progestagène RU486.
- Figure 3 : Etude comparative de la toxicité de la lovastatine sur les cellules musculaires et sur les cellules adipocytaires.
- Figure 4 : Etude comparative de la toxicité sur les cellules musculaires humaines des différentes statines utilisées en clinique humaines.
- Dans les figures 2A et 2B, l'intensité de la coloration (représentée ici par les taches sombres) augmente avec la densité cellulaire. Une série de trois puits de culture a été réalisée pour chaque concentration.

La présente invention se rapporte tout d'abord à une composition de milieu de culture destinée à la prolifération et/ou la différenciation cellulaire. On peut notamment utiliser ce milieu de culture pour assurer la prolifération et la différenciation de cellules souches et/ou progénitrices musculaires en myoblastes. Outre le milieu nutritif de base, cette composition de milieu de culture de l'invention comporte au minimum du sérum d'origine humaine et/ou d'origine animale, de l'insuline (ou un de ses dérivés) et un antioxydant et/ou une vitamine.

Le milieu nutritif de base utilisé est tamponné avec des tampons dépendants ou indépendants de la concentration en CO<sub>2</sub>. Il est préférable d'exclure le Hepès du milieu de culture comme tampon car une concentration à 15 mM inhibe sur le long terme la croissance des cellules musculaires humaines. Les milieux utilisés sont, dans la plupart des cas, constitués d'un mélange de milieu de type DME, de type Ham F12 et de type alpha MEM. Parmi ceux-ci, on peut également citer en exemple le mélange DME/F12 et DME/MCDB 202. Un milieu nutritif de base qui est particulièrement adapté lors de la mise en culture de cellules progénitrices et/ou souches, comporte également du glucose à 4,5 g/l et du bicarbonate à 3,7 g/l. Un autre exemple de milieu préféré est le milieu MCDB 120 modifié en substituant la L-valine par la D-valine.

Il est possible d'utiliser dans la composition de la présente invention du sérum d'origine animale (par exemple bovine ou équine), mais on préfère le sérum d'origine humaine que l'on peut obtenir auprès du laboratoire PAA dans le but d'éviter tout risque sanitaire de contamination chez l'homme par du sérum d'origine animale. A la place du sérum, on peut également utiliser une fraction sérique (constituée par un ou plusieurs sous-éléments du sérum) que l'on obtient couramment dans le commerce (comme l'albumine ou la transferrine humaine). Il est particulièrement avantageux de réduire le plus possible la concentration de sérum humain lors de la culture cellulaire étant donné que contrairement au sérum animal qui est abondant et dont l'approvisionnement est relativement aisé, le sérum humain quant à lui provient d'une « source » plus limitée, puisqu'il s'agit du patient et il est souhaitable de limiter le nombre de prises de sang et de lui prélever le moins de sang possible. Un mode de réalisation selon l'invention consiste à utiliser le sérum ou la fraction sérique d'origine humaine à une concentration inférieure à 5 %, et plus préférentiellement à une concentration comprise entre 1 et 3 %.

La figure 1 montre de façon surprenante que l'ajout du mélange M au sérum humain (C) permet d'obtenir une production en myoblastes améliorée de 3 fois par rapport au sérum HS (sérum humain seul) (A). Les exemples 2 et 3, dans lesquels le sérum humain et de veau fœtal respectivement sont supplémentés, illustrent ceci plus en détails.

La composition de milieu de culture cellulaire contient également de l'insuline ou des insulino mimétiques. Parmi ceux ci, on trouve des hormones appartenant à la classe des somatomédines ou insuline like growth factor, comme les IGF 1 et IGF 2 ou des métaux comme le vanadate qui inhibe un groupe spécifique de phosphatase.

Dans la composition selon l'invention, il convient d'ajouter au milieu de culture au moins un antioxydant et/ou une vitamine. Parmi les antioxydants, on préfère la N-acétylcystéine à une concentration comprise entre 0 et 10 mM ou le sélénium. Généralement, le sélénium est utilisé à une concentration comprise entre 0 et 1 mM sous forme de sodium sélénite ou de sélénométhionine (Sigma). On notera que par le terme « antioxydant », on se réfère également à une condition de culture dans laquelle on utilise une pression partielle

réduite en oxygène. Parmi les vitamines, on peut utiliser l'acide ascorbique à une concentration comprise entre 0 et 1 mM ou la nicotinamide à une concentration comprise entre 0 à 100 mM. La vitamine E est aussi utilisable. Néanmoins, l'acide ascorbique est la vitamine préférée puisqu'elle donne les meilleurs résultats comme le montre l'exemple 4.

5 A part le sérum associé aux composés précédemment décrits, il est possible d'ajouter dans le milieu de culture de l'invention un ou plusieurs composé(s) appartenant à la classe des facteurs de croissance FGF. Ces facteurs permettent aux cellules en culture, en particulier les cellules souches ou progénitrices de proliférer ainsi que de se différencier de façon spécifique. Cette classe de facteurs de croissance regroupe les bFGF, FGF-2 à 10. Généralement, on  
10 utilise ces facteurs de croissance à une concentration entre 0.1 ng/ml et 100 ng/ml.

Selon un mode de réalisation de l'invention, au moins un glucocorticoïde peut être ajouté dans le milieu de culture. Ce sont des hormones qui agissent entre autre sur le métabolisme des glucides. On peut utiliser des glucocorticoïdes naturels ou hémisynthétiques, i.e. l'hydrocortisone, la dexaméthasone, la prednisolone ou la triamcinolone. La  
15 dexaméthasone (Dex) est le glucocorticoïde préféré. Comme le montre l'exemple 5, les glucocorticoïdes ont un effet stimulant et spécifique sur la croissance cellulaire.

Un autre mode de réalisation de l'invention consiste à utiliser un ou plusieurs additifs supplémentaire(s) choisis parmi l'acide lipophosphatidique, les facteurs de croissance EGF, PDGF, hérégulines, thrombine (IL6 IL8, IL-15), LIF et hormones thyroïdiennes (dont T3, T4).

20 Il est également possible le cas échéant d'ajouter comme facteur protecteur contre les métaux lourds la transferrine. D'autres hormones ou molécules actives peuvent rentrer dans la composition du milieu de culture comme le facteur de croissance des hépatocytes, HGF/SF, et les différents facteurs caractérisés tels LIF, VEGF, SCF, TGFb, TNFa, la thrombopoïétine ou l'hormone de croissance.

25 On peut également utiliser les progestagènes et dérivés (tels que la progestérone), les œstrogènes et dérivés (tels que l'œstradiol), les androgènes et dérivés (tels que la testostérone), les minéralocorticoïdes et dérivés (tels que l'aldostérone), les hormones LH, LH-RH, FSH et TSH, l'acide rétinolique et ses dérivés, la calcitonine, les prostaglandines E2 et F2/alpha ou l'hormone parathyroïdienne.

30 Selon un mode de réalisation de l'invention, la composition définie ci-dessus convient tout particulièrement comme milieu de culture pour des cellules progénitrices et/ou souches issues de tissus musculaires.

Selon l'invention, il est préférable d'utiliser du sérum humain qui soit autologue aux cellules progénitrices et/ou souches mises en culture car cela permet de supprimer tout risque  
35 de contamination qui existe lors de l'utilisation d'un sérum hétérologue. Il en résulte dans ce cas que le traitement du sérum avant son utilisation dans le cadre de la culture cellulaire n'est plus nécessaire.

L'invention se rapporte aussi à un procédé de production de myoblastes au cours duquel les cellules progénitrices et/souches musculaires sont mises en culture sur un milieu de culture dont la composition a été définie ci-dessus. Ce procédé de production peut être divisé en les phases suivantes :

- 5       - extraction : les cellules sont obtenues à partir de tissus musculaires par exemple par traitement enzymatique,
- amplification : les cellules obtenues lors de l'étape précédente sont mises en culture, elles subissent une croissance sélective,
- congélation des cellules issues de l'amplification (le cas échéant),
- 10       - caractérisation des cellules issues de l'amplification avant leur réimplantation chez le patient.

Préalablement à ce procédé de production, on effectue une biopsie musculaire pour récolter les cellules progénitrices et/ou souches. Elle a lieu sous anesthésie locale par incision. La taille du prélèvement est d'environ 1 gr, dont il est possible d'extraire  $10^6$  cellules. Une  
15 fois la biopsie effectuée, le tissu est placé dans le milieu de protection. Ce milieu de protection consiste essentiellement au milieu nutritif de base évoqué auparavant, auquel on peut ajouter des antibiotiques tels que la gentamycine, qui est préféré pour son caractère moins allergique aux dérivés de la pénicilline ; des facteurs protecteurs comme la carnitine (1 mM), insuline (10  $\mu$ g/ml), dexaméthasone ( $5 \cdot 10^{-9}$  M), l'acide ascorbique, la nicotinamide  
20 et le tréalose. La température doit être inférieure à 25°C et supérieure à 4°C. Il est préférable que le volume de milieu de transport soit d'au moins 10 fois supérieur au volume du tissu musculaire et que le temps de transport n'excède pas 24 heures. Les cellules peuvent être notamment obtenues à partir du vaste externe, vaste interne, biceps, quadriceps, jambiers, gastrocnémiens, péronier, deltoïdes, grand dorsal, sterno-cleido-mastoïdien, intercostal,  
25 homo-hyoïdien, grand droit ou du psoas. Une étape d'éminçage peut être réalisée pour permettre une meilleure dissociation enzymatique ultérieure. Elle consiste à découper la biopsie en sections d'une taille de préférence inférieure à 0,5 mm placées dans un milieu de culture adapté. L'éminçage peut être réalisé manuellement à l'aide de ciseaux fins. On peut également effectuer l'éminçage de manière assistée, à l'aide par exemple de broyeurs à  
30 couteaux mus par l'énergie électrique ou mécanique. Un exemple d'un tel broyeur utilisable est le broyeur Medimachine (distribué par Becton-Dickinson).

Un mode de réalisation de l'invention consiste à extraire les cellules des tissus musculaires. En effet, les tissus musculaires sont constitués de fibres musculaires, au sein desquelles les cellules satellites sont situées sous la lame basale des celles-ci. L'étape de  
35 dissociation des fibres musculaires et de décollement des cellules satellites permet d'isoler ces dernières. L'étape de dissociation préférée selon l'invention consiste en l'utilisation d'enzymes de digestion de la matrice extracellulaire. Le choix des enzymes et leurs concentrations utilisées pour la dissociation des fibres musculaires et des cellules satellites des tissus prélevés



est guidé par l'étude de leur efficacité enzymatique, les critères recherchés sont une concentration d'enzyme la moins élevée possible et un temps d'incubation minimal pour une efficacité similaire. Le rendement en cellules obtenues après filtration dépend en partie de la qualité de l'étape de dissociation enzymatique. Des enzymes de digestion utilisables dans le procédé de l'invention seules ou en association sont, par exemple, toutes les collagénases, incluant les types IA, S et H partiellement purifiées, ainsi que la forme purifiée commercialisée sous le nom de Libérase par Roche-Boehringer, la pronase, ou les trypsines, de toutes origines, en solution dans des tampons contenant ou non de l'EDTA, les dispases (aussi connues sous le nom de protéases), les élastases, ou encore, les hyaluronidases. Notamment les associations enzymatiques trypsine-collagénase ou pronase-collagénase conviennent comme le montre les résultats de l'exemple 1. Parmi ces dernières, on préfère la combinaison pronase-collagénase, car ce sont des enzymes d'origine non-extractive, permettant ainsi de s'abstraire de tout risque sanitaire de contamination par le prion ou des virus. Il est également possible d'utiliser la collagénase comme enzyme unique. Il est préférable d'effectuer cette étape d'extraction par processus séquentiel afin de minimiser le temps d'exposition des cellules aux enzymes. Il est également souhaitable que la durée des traitements enzymatiques n'excède pas 10 minutes et d'utiliser une température de traitement comprise entre 20 et 25°C. Pendant toute cette étape, le milieu utilisé est le milieu de protection. L'inhibition de l'action des enzymes se fait par dilution, lavage et centrifugation.

Des variantes du traitement d'extraction sont applicables. D'une part, on peut effectuer l'étape de dissociation en deux temps; une première incubation en présence de collagénase et une deuxième incubation en présence de trypsine. D'autre part, il est possible de compléter la dissociation enzymatique par une dissociation mécanique par aspiration et refoulement de la suspension au travers d'une pipette.

Il est alors possible de suivre l'efficacité de la digestion enzymatique par l'observation microscopique des cellules libérées du fragment tissulaire. Par cette observation, on peut constater la présence de cellules de taille variée, d'hématies et de fragments de sarcomères. Ces fragments de sarcomères sont de bons indicateurs de l'efficacité de la digestion enzymatique du tissu musculaire. Il est recommandé de soumettre à nouveau le fragment tissulaire non digéré par les enzymes à une nouvelle digestion enzymatique selon le même traitement que précédemment décrit. Il est particulièrement approprié de renouveler l'opération 5 fois. Les cellules peuvent être congelées à ce stade (avant la mise en culture) selon un protocole bien connu dans le domaine de l'art.

L'invention porte également sur le procédé de production de myoblastes au cours duquel l'étape d'amplification cellulaire est réalisée en utilisant le milieu de culture tel que déjà décrit. Au terme de cette phase d'amplification, on obtient majoritairement une population cellulaire de myoblastes, c'est à dire dans laquelle on trouve au minimum 70 % de myoblastes. Cette étape de croissance cellulaire est suivie par une étape de différenciation :

ainsi on remplace le milieu de croissance précédemment décrit par un milieu de différenciation dont un exemple est fourni ci-après (exemple 6).

Afin d'améliorer la croissance des précurseurs myogéniques, il est courant d'utiliser dans le domaine de culture cellulaire du collagène ou ses dérivés comme la gélatine. Or, ces substances sont obtenues par extraction de carcasse bovine, ce qui pose un problème de risque sanitaire de contamination, par exemple, par le prion. L'invention se propose donc de résoudre ce problème en utilisant une protéine qui est obtenue par génie génétique. Une molécule disponible dans le commerce appelée Pronectin F, qui est un polymère du fragment RGDS de la fibronectine, convient tout particulièrement. Ayant une efficacité comparable à la gélatine pour la croissance des cellules humaines comme celles précurseurs du tissu musculaire, cette protéine peut être alors utilisée dans le cadre de l'invention en tant que substrat. Il est aussi possible d'utiliser des polymères du L-lysine ou de D-lysine.

Il est préférable que les cellules soient mises en culture dans un réacteur adapté pour la culture de cellules adhérentes. Afin de s'affranchir des contraintes de contrôles de la vitesse d'agitation, de sa régularité et de l'homogénéité des préparations, le réacteur de culture est de préférence statique. Il doit présenter une grande surface de culture par rapport aux supports classiques (boîtes de Pétri, flasques) de manière à récolter en quelques jours une population cellulaire importante. Un exemple d'un tel réacteur de culture est le dispositif de culture en plateaux (simple, double et/ou multi-étagé).

Le dispositif de culture utilisable dans le procédé permet également de procéder à l'échantillonnage des cellules de manière stérile. Ceci permet de réaliser à des prélèvements nécessaires à l'identification des types cellulaires présents aux différents stades de la culture par analyse de marqueurs spécifiques. Il permet la vidange des milieux, le lavage et le décollement des cellules et enfin leur récolte de manière stérile.

Des poches peuvent être utilisées et des tubulures stériles spécialement adaptées reliant les poches au réacteur pour permettre les transvasements des milieux ou la récolte des cellules. Ce dispositif permet ainsi de réaliser un grand nombre d'opérations en système clos. Selon la population cellulaire souhaitée, le nombre de jours de culture varie de 0 à 45 jours.

De plus, la culture peut être poursuivie par des techniques classiques d'expansion ou de perfusion pendant une durée pouvant atteindre plusieurs mois.

Afin d'augmenter le nombre de cellules récoltées, une ou plusieurs phases d'expansion sont possibles. Les phases d'expansion comprennent une étape de décollement des cellules, de lavage des cellules et de remise en culture sur une plus grande surface de culture, les solutions et enzymes utilisées pour réaliser ces étapes étant bien connues de l'homme du métier.

En particulier, le procédé de l'invention comprend au moins une phase d'expansion de cellules. Un tel procédé permet de multiplier le nombre de cellules tout en assurant la différenciation des cellules progénitrices et/souches initiales majoritairement en myoblastes en fin de culture de chaque expansion. Selon un mode de réalisation de l'invention, on

procède à une congélation d'une partie des cellules ayant subi l'étape d'amplification. Un protocole de congélation est fourni dans l'exemple 8. Par exemple, on peut congeler 1/5 de la culture, soit approximativement  $2 \cdot 10^5$  cellules, les 4/5 restants étant soumis à un processus d'amplification cellulaire. Afin de permettre l'utilisation dans le temps des cellules ainsi préparées, il peut être avantageux de les congeler dans des conditions telles que la décongélation ultérieure permette une survie des cellules suffisante, de préférence supérieure à 90 %. A titre d'exemple, les cellules sont suspendues dans le milieu de congélation. Ces compositions de milieux de congélation sont typiquement du milieu DME/F12 avec 1 mM L-carnitine, 0.2521 mM d'acide ascorbique, de  $5 \cdot 10^{-9}$  M dexaméthasone, 10 µg/ml d'insuline et 2 % de sérum humain et transférées dans deux poches de congélation stériles, à une concentration comprise entre  $10^5$  à  $10^7$  cellules par ml cellules/ml ou dans des tubes de cryocongélation à une concentration comprise entre  $10^5$  à  $10^7$  cellules par ml. Dans ces conditions l'agent préservant est le DMSO à la concentration de 10 %. On peut ajouter à ce milieu de congélation de L-Arginine du tréhalose (jusqu'à 0.5 M). Par immersion des cellules dans ce dioside, cela permet d'améliorer la conservation de celles-ci. La congélation est réalisée à l'aide d'un dispositif (Digicool ou Nicool) assurant une descente progressive en température contrôlée. Les cellules sont stockées dans l'azote liquide jusqu'au moment de la décongélation. On peut procéder à une décongélation des cellules congelées après culture par exemple au bain-marie à 37°C. Les préparations cellulaires sont lavées deux fois à l'aide d'une solution saline isotonique. Les rinçages sont effectués par connexion stérile aux poches de solution isotonique et aux poches de vidange. Une aliquote est réservée pour l'estimation de la viabilité et de la qualité cellulaire.

Après amplification cellulaire, il convient d'effectuer une séparation des cellules par digestion enzymatique. Lors de cette étape et dans le but de réduire les risques sanitaires, il est recommandable d'utiliser de la trypsine d'origine recombinante que l'on trouve couramment dans le commerce.

Avant de procéder à la transplantation cellulaire dans le cadre des futures applications cliniques, il peut être préférable selon l'invention de caractériser au niveau moléculaire et fonctionnel la suspension cellulaire obtenue par le procédé de production des myoblastes décrit ci-dessus. Cette caractérisation peut être réalisée par l'analyse de marqueurs cellulaires par cytofluorimétrie de flux ou FACS, après marquage des antigènes de surfaces ou de tout antigène spécifique des différents types cellulaires à analyser. Dans le présent texte, le terme « marqueurs cellulaires » indique tout antigène cellulaire permettant d'apporter des informations à lui seul ou en combinaison avec d'autres marqueurs sur un type cellulaire. Cette caractérisation peut être entreprise au niveau protéique grâce à l'utilisation d'autres marqueurs cellulaires tels que :

- P-Cam comme marqueur de cellule endothéliales
- N-Cam comme marqueur de cellule neuronales et musculaires

- « Smooth muscle actin » comme marqueurs du muscle lisse
- GFAP comme marqueur de cellules gliales
- MyoD Myf5, Pax3, Pax7, C-met et M-cadhérine N-cam comme marqueurs de cellules musculaires
- 5 - Sca1+, C-Kit, CD45, CD34 et CD56 comme marqueurs de cellules souches
- PCNA, P21, P16, Ki67 comme marqueurs du cycle cellulaire.

On peut également procéder à cette caractérisation au niveau de la transcription par l'utilisation de biopuces (« gene array ») contenant des oligonucléotides codant pour des gènes cellulaires (par exemple, facteurs de transcription spécifiques et facteurs de la  
10 machinerie du cycle cellulaire) permettant d'identifier les cellules de la suspension cellulaire.

L'obtention d'une population cellulaire de degré de pureté élevé peut se révéler nécessaire pour certaines utilisations en tant que produit de thérapie cellulaire. Il apparaît clairement que l'homme du métier pourra mettre en œuvre les différentes techniques proposées dans l'état de l'art pour faire un tri sélectif des dites cellules. A titre d'exemple,  
15 citons les techniques de tri par clonage, par cytofluorimétrie de flux ou encore par colonnes d'immunoaffinité ou immunomagnétiques utilisant des anticorps spécifiques des cellules en cause. Dans ce but, il convient d'utiliser à la fois des caractérisations moléculaires et des caractérisations biologiques fonctionnelles. Les marqueurs cellulaires choisis permettent d'identifier les cellules précurseurs des fibres musculaires. Cette identification est faite non  
20 part un marqueur unique mais par une combinaison de marqueurs. Il s'agit de marqueurs membranaires comme les N-Cam, Vla4, M-cadhérine, intégrines, CD56, de marqueurs cytoplasmiques comme la desmine et de marqueurs nucléaires comme les pax 7 et myoD. Pour augmenter la capacité de colonisation et de croissance une fois implantées dans l'organisme les cellules utilisées pour la thérapie cellulaire sont positives pour des marqueurs  
25 de la machinerie du cycle cellulaire comme Ki67, PCNA et négatives pour les inhibiteurs du cycle cellulaire comme P21 et P16. D'autre part ces cellules sont négatives pour des marqueurs terminaux de la différenciation terminale musculaire comme la myogénine et la troponin T (TNT). On procède à l'analyse de la fonctionnalité cellulaire par des tests biologiques en culture. Ces tests ont pour but de déterminer dans un échantillon cellulaire la  
30 capacité à former des colonies en culture et la fréquence de colonies myogéniques. Ce test peut être pratiqué, soit après l'extraction cellulaire, soit avant la congélation, soit après la congélation. Le principe est basé sur l'analyse de la croissance à basse densité et sur la révélation du phénotype cellulaire par l'utilisation de milieu de différenciation spécifique. A noter que l'on se doit de garder une densité d'ensemencement cellulaire la plus faible  
35 possible. Au préalable, on soumet les cellules progénitrices/souches à une phase de croissance, suivie par une phase de différenciation cellulaire. Les cellules résultantes sont alors fixées par une solution alcoolique, colorées au giemsa selon un protocole bien connu

dans le domaine de l'art puis photographiées par appareil numérique. Dans le cadre du test de fonctionnalité, elles ci sont alors soumises :

- à une observation macroscopique qui permet de dénombrer le nombre total de colonies et de déterminer ainsi le pourcentage de cellules qui présente un potentiel de croissance clonale,
- à une observation microscopique qui permet de déterminer le nombre et le pourcentage de colonies de précurseurs musculaires. Les colonies de précurseurs musculaires forment par fusion cellulaire des cellules polynuclées fusiformes, les myotubes qui dans l'organisme formeront les fibres musculaires.

Ce test fonctionnel est illustré par l'exemple 6. La présente invention couvre également toute population cellulaire qui est contenue dans le milieu de culture tel que défini ci-dessus. On entend par population cellulaire toute population de cellules non pure, contenant en général un type cellulaire dominant et un ou plusieurs types cellulaires minoritaires. Ce mode de réalisation porte donc sur une population majoritairement de cellules progénitrices et/ou souches (c'est à dire avant que la phase d'amplification ait lieu), sur une population enrichie en myoblastes (suite à l'étape d'amplification cellulaire), mais également sur une population « intermédiaire », ce qui correspond au cas où aucune catégorie de ces cellules n'est majoritaire, c'est à dire au cours du processus d'amplification. Il peut donc s'agir d'un mélange de différents types cellulaires.

L'invention se rapporte à l'utilisation d'une population cellulaire dont le type cellulaire dominant est constitué de cellules myoblastiques dans la préparation d'un produit de thérapie cellulaire pour la reconstitution chez l'homme des tissus musculaires squelettiques, cardiaques et viscéraux et des tissus vasculaires.

Selon un mode de réalisation préféré, la population de myoblastes en tant que produit de thérapie cellulaire est utilisée pour traiter l'incontinence urinaire chez l'homme ou la femme. Celle-ci peut avoir comme origine une pression insuffisante pour fermer l'urètre, la résistance normale de l'urètre étant pour moitié due au sphincter lisse et pour moitié due au sphincter strié de l'urètre moyen.

On peut également utiliser ce produit de thérapie cellulaire pour traiter les incontinenes suite au traitement du cancer de la prostate ainsi que la dystrophie musculaires innées ou acquises. Chez des patients dystrophiques, la transplantation de myoblastes permet la restauration de l'expression de la dystrophine. Elle consiste par exemple à injecter à l'aide d'une aiguille les cellules d'origine musculaire obtenues par un procédé de l'invention directement dans le muscle squelettique ou dans la circulation générale.

Un produit de thérapie cellulaire apte à l'administration humaine comprend une solution isotonique dans laquelle les cellules sont remises en suspension. Il est préférable que cette solution soit être exempte des composants toxiques présents dans les milieux de congélation.

Dans le cas du traitement de l'incontinence urinaire, cela consiste notamment à injecter à l'aide d'une aiguille une population de cellules, dont le type dominant a les caractéristiques de cellules myoblastiques, obtenue et préparée comme produit de thérapie cellulaire, directement dans l'urètre ou le rhabdosphincter, ceci dans le but d'améliorer la fonction du mécanisme de fermeture urétrale. Le nombre de cellules injectées est compris entre  $10^5$  et  $10^7$  cellules.

Il est également possible de contrôler l'injection des myoblastes par une sonde ultrasons transurétrale, et de mesurer la pression urétrale avant et après l'injection, permettant ainsi d'estimer les changements de pression de fermeture urétrale à l'aide d'IRM en particulier.

Au cours des phases de culture et d'expansion des cellules dans les procédés fournis par l'invention, une étape de modification génétique des cellules par transfection d'un acide nucléique hétérologue peut être réalisée. L'acide nucléique est choisi de manière à permettre l'expression d'un polypeptide ou d'une protéine dans les cellules transfectées. Les cellules transfectées sont ensuite transplantées et permettent la délivrance du polypeptide ou de la protéine exprimés à partir de l'acide nucléique hétérologue, le dit polypeptide ou protéine étant un produit biologiquement actif. L'invention porte ainsi sur l'utilisation d'une population de cellules comme produit de thérapie cellulaire en tant que plate-forme de délivrance d'un produit biologiquement actif. Pour modifier génétiquement les cellules précurseurs, il est préférable d'utiliser une approche virale qui permette de modifier rapidement et efficacement les cellules en culture. Les rétrovirus de type Moloney sont dans ce cas particulièrement efficaces. Il est possible d'insérer dans ce virus un marqueur moléculaire comme par exemple une protéine fluorescente de type GFP (exemple 7). Les cellules ainsi modifiées représentent un outil pour tracer le devenir cellulaire une fois introduite dans l'animal.

Un autre mode de réalisation selon l'invention consiste à utiliser la population de myoblastes dans le criblage toxicologique et/ou pharmacologique. L'objectif est de raccourcir au maximum les phases de développement et de tests précliniques et cliniques afin de répondre au plus vite aux besoins des malades. En effet, il est avantageux d'utiliser cette population de cellules en tant que « modèle » dans le développement de médicaments, permettant ainsi d'effectuer un criblage à haut débit. Il sera alors possible d'élucider les mécanismes à l'origine des maladies et de trouver des cibles thérapeutiques ou des molécules candidates à devenir des principes actifs. Ce criblage peut également servir en toxicologie, notamment à étudier les interactions médicamenteuses.

Le spécialiste en pharmacologie/toxicologie connaît bien la façon de mettre en œuvre des techniques automatisées, et saura sélectionner les molécules d'intérêt, en fonction de la cible à atteindre, à partir de banques de plusieurs milliers de molécules nouvelles ou déjà exploitées en tant que médicament pour d'autres pathologies. Un mode de réalisation préféré selon l'invention consiste à utiliser le criblage pharmacologique/toxicologie pour détecter des molécules cibles impliquées dans la rhabdomyolyse, c'est à dire la lyse des muscles striés.

En effet les accidents mortels avec les inhibiteurs de la synthèse du cholestérol de la famille des statines (inhibiteurs de la HMG Coareductase) ont remis le tissu musculaire au premier plan comme cible toxicologique. La mauvaise évaluation de ce risque connu par Bayer pour la Cerivastatine a eu des conséquences humaines et économiques considérables.

De très nombreuses drogues sont susceptibles d'entraîner des myopathies. Dans les cas aigus et graves, on assiste à une lyse importante du tissu musculaire (rhabdomyolyse) dont le mécanisme est encore mal connu. Plusieurs hypothèses ont été émises. Certaines invoquent une augmentation de la perméabilité membranaire et d'autres des anomalies au niveau des mitochondries.

Dans la grande majorité des cas, il s'agit d'accidents survenant dans un contexte de poly chimiothérapie suggérant le rôle d'interactions médicamenteuses (macrolides, immunosuppresseurs, anticancéreux, fibrates, cocaïne, antiprotéases du HIV, anesthésiques...).

Parmi les nombreux acteurs impliqués : les cytochromes P450, les molécules impliquées dans l'apoptose comme BCL2, les antioxydants, les protéines du complexe NFKb, les PPARs ou les interventions chirurgicales.

À l'exception des accidents aigus, menaçant le pronostic vital (rhabdomyolyse), les signes cliniques d'une atteinte musculaire sont frustrés, douleurs musculaires (myalgies), fatigabilité, crampes et les signes biologiques en dehors des accidents aigus les CPK sont très fréquemment normaux. Dans les cas des statines, des données récentes indiquent que les sujets présentant des atteintes musculaires ne montrent ni de corrélations entre le niveau plasmatique de cet agent pharmacologique et l'atteinte toxique, ni d'élévation des CPK. Dans ces cas l'histologie révèle dans le tissu musculaire des modifications des mitochondries (gonflement) et des accumulations de gouttelettes lipidiques.

Parmi les molécules cibles potentielles, on peut citer : inhibiteurs de l'HMG-coenzyme A réductase, créatine kinase, les statines, les fibrates, les anesthésiques, l'héroïne, les macrolides, la cyclosporine ainsi que leurs dérivés.

La section suivante présente des exemples détaillés qui est destiné à illustrer la présente invention. Toutefois, celui-ci n'est pas limitatif dans le sens que l'homme de l'art pourra, avec ses connaissances du domaine, apporter quelques variantes qui sont également couvertes par l'invention.

#### Exemple 1 :

*Extraction cellulaire d'une biopsie de tissu musculaire en absence de protéines d'origine extractives.*

Il s'agit dans cette expérience de comparer l'efficacité de différents protocoles d'extraction cellulaire. Le protocole de référence utilise un mélange de deux enzymes (trypsine et la collagénase). La trypsine est d'origine porcine et la collagénase est d'origine bactérienne. L'action de ces enzymes est stoppée par la présence de sérum de veau fœtal. Dans les protocoles suivants, on a choisi des enzymes d'origine bactérienne et le sérum de veau fœtal a été éliminé.

Les cellules progénitrices/souches utilisées proviennent de biopsie de tissu musculaire de brebis adulte.

Le protocole d'extraction cellulaire est de type séquentiel. L'inhibition de l'action des enzymes se fait par dilution, lavage et centrifugation. La durée des traitements enzymatiques n'excède pas les 10 minutes. La température de traitement est située entre 20 et 25°C. Le tissu musculaire (1 g de tissu après éminçage) est mis en présence de la solution enzymatique (10 ml) c'est à dire au moins 10 fois supérieure au volume du tissu musculaire. La solution enzymatique est constituées par une combinaison de collagénase (0.5 mg/ml) - trypsine (1 mg/ml) sans ajout de sérum, ou la combinaison collagénase (0.5 mg/ml)-pronase (1 mg/ml) avec ou sans ajout de sérum fœtal de veau, ces enzymes étant solubilisées dans du DME/F12 additionné de 15 mM Hepes.

Le milieu de base supplémenté (sans sérum) utilisé pour l'extraction cellulaire est du DME/F12 additionné de 15 mM Hepes, insuline humaine à 10 µg/ml, FGF 2 à 10 ng/ml, dexaméthasone à  $5 \cdot 10^{-9}$  M, de l'acide ascorbique à (0.252 mM) et de la L-carnitine à 1 mM. Après 10 minutes de contact avec la solution enzymatique, l'ensemble (solution enzymatique et fragment tissulaire) est dilué dans un volume de 30 ml pour inhiber les enzymes puis soumis à une centrifugation lente (inférieure à 10 g pendant 3 minutes). Par ce procédé, on récupère le surnageant qui contient les cellules extraites par la première digestion enzymatique et le fragment tissulaire restant. Pour récupérer les cellules de la première digestion une centrifugation à 200 g est effectuée pendant 3 minutes environ. Les cellules ainsi obtenues sont remises en suspension dans le milieu sans sérum. L'efficacité de la digestion enzymatique est suivie par l'observation microscopique des cellules libérées du fragment tissulaire. Le fragment tissulaire restant est de nouveau soumis à une digestion enzymatique selon le même protocole. Cette opération est répétée cinq fois de suite.

Le substrat utilisé pour l'attachement cellulaire est la gélatine bovine. On utilise comme milieu de culture du DME/F12 supplémenté par du sérum de veau fœtal à 20 %, de l'insuline à 10 µg/ml, de la dexaméthasone  $5 \cdot 10^{-9}$  M et du FGF 2 à 10 ng/ml. Les conditions de culture sont les suivantes : la température est de 37°C sous atmosphère humide, 20 % d'oxygène et 5 % de gaz carbonique. Le temps de culture est de 7 jours. Les cellules sont fixées par une solution alcoolique et sont colorées par le colorant giemsa. Les boîtes sont alors photographiées.



Les résultats indiquent que le nombre de cellules observées dans les trois différentes conditions d'extraction : trypsin + collagénase sans sérum bovin, pronase + collagénase avec sérum bovin (FCS) et pronase + collagénase sans sérum bovin (FCS) après une semaine de culture sont semblables ainsi que leur potentiel de différenciation. Cet exemple montre l'efficacité des techniques d'extraction cellulaire en utilisant des enzymes d'origine non extractive comme la pronase et/ou la collagénase.

#### Exemple 2 :

*Effet de la « supplémentation » du sérum humain sur l'amplification des cellules musculaires précurseurs humaines.*

Dans cette expérience les cellules humaines sont issue d'une biopsie d'un sujet normal. On réalise l'étape d'extraction cellulaire comme précédemment.

Dans un premier temps, les cellules sont amplifiées en culture en présence de sérum humain (laboratoire PAA) puis ensemencées dans les différentes conditions décrites. Les facteurs de croissance FGF2, EGF, PDGF A/B sont produites par Preprotech et la thrombine est obtenue auprès de Sigma.

Au cours de la culture cellulaire, on utilise :

- 2 boîtes multipuits de 12 (TPP)
- gélatine bovine (Merck)
- 10000 cellules/puits
- 1 ml de milieu /puits

On prépare les différents milieux de culture de la façon suivante : le milieu nutritif de base est le DME, auquel on ajoute :

- aucun supplément (0)
- 1 % de sérum humain (1 % HS)
- 5 % de sérum humain (5 % HS)
- Mélange M : FGF2 (10 ng/ml ) + insuline (10 µg/ml) + PDGF (1 ng/ml) +EGF (10 ng/ml)+ dexamethasone ( $5.10^{-9}$  M) + thrombine (1 unité)
- 1 % de sérum humain + mélange M (1 % HS + M)
- 5 % de sérum humain + mélange M (5 % HS + M)
- 20 % de sérum de veau fœtal (20 % FCS)

Il est à préciser que le mélange M ne contient pas de protéines d'origine animale.

Un deuxième changement de milieu est effectué 3 jours après le premier. Après 3 jours de culture (total de 7 jours), on réalise la fixation et la coloration au giemsa. On effectue la détermination du nombre sur les cellules fixées et colorées.

Les résultats (exprimés en nombre de cellules par puits) sont indiqués dans le tableau 1 suivant :

Tableau 1Effet de supplémenter le sérum humain (HS) sur la croissance cellulaire

Milieu de culture testé	Nombre de cellules/puits
0	$10^4$
1 % HS	$5 \times 10^4$
5 % HS	$7 \times 10^4$
M	$4 \times 10^4$
1 % HS + M	$23 \times 10^4$
5 % HS + M	$31 \times 10^4$
20 % FCS	$11 \times 10^4$

D'après ces résultats, on observe que la combinaison du cocktail de facteur de croissance et du sérum humain permet d'obtenir une croissance de trois fois supérieure à celle obtenue en présence de sérum de veau fœtal non supplémenté. Dans ces conditions le facteur d'amplification est supérieur à 30 après une semaine de croissance. De façon surprenante, il est important de noter que le sérum humain aux concentrations de 1 % et 5 % supplémenté par le mélange M stimule fortement la prolifération cellulaire puisqu'à ces faibles concentrations, on obtient, respectivement, un doublement et un triplement du nombre de myoblastes par rapport au sérum fœtal de veau à 20 % non supplémenté. Enfin, le sérum supplémenté par le mélange M améliore de plus de 4 fois la prolifération comparativement au sérum non supplémenté.

Exemple 3 :

*Amélioration du potentiel de croissance des précurseurs des cellules musculaires en présence de sérum de veau fœtal supplémenté.*

Dans cette expérience, les étapes d'extraction cellulaire et d'amplification sont similaires à celles précédemment décrites. Cependant, on les paramètres de culture utilisés sont définies comme suit : on choisit des cellules humaines normales obtenues au passage 7 après l'extraction cellulaire. La température est de 37°C dans une atmosphère humide avec 20 % d'oxygène et 5 % de gaz carbonique. La densité cellulaire est de  $10^3$  cellules par boîte de culture. Le substrat utilisé est de la gélatine.

Comme milieu de culture pour la phase de croissance, on teste du :

- DME/F12 auquel on ajoute du sérum de veau fœtal à 20 %,
- DME/F12 auquel on ajoute du sérum de veau fœtal à 20 % supplémenté par de l'insuline (10 µg/ml), acide ascorbique (0.252 mM), FGF2 (10 ng/ml),
- PDGF (1 ng/ml), EGF (10 ng/ml), thrombine (1 unité), LPA (5 mM).

La durée de croissance est respectivement de 10 jours et 7 jours avec des changements de milieu tous les trois jours.

Après fixation alcoolique, et coloration au giemsa, on effectue une photographie numérique des boîtes de pétri.

Les résultats sont consignés dans le tableau 2 suivant.

Tableau 2

Effet de supplémenter le sérum foetal de veau (FCS) sur la croissance cellulaire.

Milieu de culture testé	Nombre de cellules/puits
FCS à 20 %	$11.10^3$
FCS à 20 % + insuline + acide ascorbique + FGF + PDGF + EGF + thrombine + LPA	$54.10^3$

D'après les résultats obtenus, on observe de façon surprenante une amélioration très importante du nombre de cellules musculaires humaines suite à l'addition du cocktail précité par rapport au sérum de veau foetal seul, puisque ce nombre de cellules est augmenté par un facteur 5 sur une période de croissance de 7 jours seulement.

Exemple 4 :

*Effet de l'acide ascorbique et de la nicotinamide sur l'amplification des cellules humaines musculaires précurseurs.*

Dans cette expérience les cellules humaines sont issues d'une biopsie d'un sujet normal âgé de 16 ans.

Les protocole d'extraction utilisé est identique à celui de l'exemple 1. Dans l'étape d'amplification, on procède comme dans l'exemple précédent, sauf qu'on utilise comme milieu de culture, du DME/F12 supplémenté par soit :

2 % de sérum humain + mélange M (insuline ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) + dexaméthasone ( $5.10^{-9} \text{ M}$ ) + FGF2 ( $10 \text{ ng/ml}$ ) + EGF ( $10 \text{ ng/ml}$ ) + thrombine (1 unité) (désigné comme 2 %HS + M)

le sérum supplémenté précédent (2 %HS + M) auquel on ajoute de l'acide ascorbique à une concentration de  $0.252 \text{ mM}$

le sérum supplémenté (2 %HS + M) auquel on ajoute de la nicotinamide à une concentration de  $10 \text{ mM}$

le sérum supplémenté (2 %HS + M) auquel on ajoute de l'acide ascorbique et de la nicotinamide aux concentrations précédentes.

Au cours des 8 jours de culture, on effectue 3 changements de milieu de culture. Au terme de cette période, on colore les cellules selon le même mode opératoire que précédemment.

Les résultats (exprimés en nombre de cellules par puits) sont indiqués dans le tableau 3 suivant :

Tableau 3

Effet de supplémenter le sérum humain (HS) par de l'acide ascorbique et/ou de la nicotinamide sur la croissance cellulaire.

Milieu de culture testé	Nombre de cellules/puits
2 %HS + "M"	$10^4$
2 %HS + "M" + acide ascorbique	$32 \times 10^4$
2 %HS + "M" + nicotinamide	$8 \times 10^4$
2 %HS + "M" + acide ascorbique + nicotinamide	$18 \times 10^4$

L'addition d'acide ascorbique, utilisé dans cette expérience comme antioxydant, permet de doubler le nombre de cellules amplifiées après une période de 8 jours de culture. En utilisant la nicotinamide comme autre antioxydant, aucun effet positif sur la croissance est observé. L'addition de ces deux antioxydants donne un résultat intermédiaire, elle permet une augmentation du nombre de cellules amplifiées mais pas au même niveau qu'avec de l'acide ascorbique seul.

#### Exemple 5 :

*Effet spécifiques des glucocorticoïdes sur la croissance des cellules précurseurs des fibres musculaires*

On utilise des cellules de rat obtenues au passage 23 après l'extraction cellulaire. La température d'incubation est de 37°C dans une atmosphère humide avec 20 % d'oxygène et 5 % de gaz carbonique. La densité cellulaire est de  $3.10^3$  cellules par multiples de 12. Le substrat est la gélatine.

Comme milieu de culture pour la phase de croissance, on utilise du DME/F12 auquel on ajoute du sérum de veau fœtal à 20 % supplémenté par de l'insuline (10 µg/ml) et du FGF (10 ng/ml).

A ce milieu, il est ajouté :

- soit de la dexaméthasone à des concentrations croissantes (de  $10^{-6}$  M à  $10^{-10}$  M)
- soit des hormones stéroïdiennes (œstradiol, testostérone, progestérone, DEHA, SDEAH, aldostérone) seules ou en association comme la dexaméthasone avec l'anti-progestagène RU486) à une concentration fixe ( $10^{-7}$  M).

La durée de culture est de 5 jours sans changement de milieu.

Après fixation alcoolique et coloration au giemsa, on effectue une prise photographique numérique.

Les résultats sont indiqués dans les figures 2A et 2B.

D'après ces résultats, on montre que l'ajout de dexaméthasone améliore très nettement la prolifération cellulaire et que sa concentration optimale est comprise entre  $10^{-6}$  M. à  $5.10^{-9}$  M. De plus, l'effet de ce glucocorticoïde est spécifique sur la croissance des cellules précurseurs musculaires contrairement aux autres hormones stéroïdiennes testées qui n'améliorent pas la croissance. Enfin, la présence d'un anti-progestagène comme le RU486 abolit l'effet des glucocorticoïdes.

#### Exemple 6 :

##### *Test fonctionnel des précurseurs des cellules musculaires humaines*

On utilise des cellules humaines saines au passage 1 après l'extraction. Les conditions de culture cellulaire sont les suivantes : la température est de 37°C, atmosphère humide, 20 % d'oxygène et 5 % de gaz carbonique. La densité cellulaire est de  $10^3$  cellules par boîte culture qui sont issues d'un tissu musculaire de 100 mm. Le substrat est la gélatine. Le milieu de culture utilisé dans cette expérience pour la phase de croissance est le DME/F12 auquel on ajoute du sérum de veau fœtal à 20 %, de l'insuline humaine à 10 µg/ml, de la dexaméthasone à  $5.10^{-9}$  M et du FGF à 2 10 ng/ml. Le temps de croissance est de 9 jours avec des changements de milieu tous les trois jours. Ensuite, on utilise comme milieu de différenciation le DME/F12 auquel on ajoute du sérum humain à 2 %, de l'insuline à 10 µg/ml, de l'EGF à 10 ng/ml, de l'hormone thyroïdienne T3 à  $5.10^{-9}$  M. Le temps de différenciation est de 4 jours avec un changement tous les 2 jours. On effectue ensuite une fixation alcoolique, une coloration au giemsa et on procède à la photographie numérique des boîtes.

D'après cette expérience, l'observation macroscopique permet de compter 107 colonies. Parmi celles-ci, on peut remarquer deux types de colonies. Les colonies du premier type sont colorées de manière intense et l'observation microscopique révèle la présence de nombreuses cellules musculaires différenciées les myotubes : il s'agit de colonies formées de précurseurs musculaires. Les colonies du second type, plus pâles à l'observation macroscopique, ne contiennent aucun myotube : il s'agit de colonies de cellules non-musculaires.

Les résultats sont les suivants : parmi 107 colonies totales, on dénombre 91 colonies de cellules précurseurs du tissu musculaire et 16 colonies de cellules non musculaires. Ainsi, globalement, parmi 1000 cellulesensemencées, 10.7 % des cellules sont capables de former des colonies et parmi celles-ci 85.6 % sont capables de former des colonies de cellules précurseur de tissu musculaire.

#### Exemple 7 :

##### *Modification génétique des cellules précurseurs des fibres musculaires.*

Pour modifier génétiquement les cellules précurseurs, nous avons utilisé un rétrovirus de type Moloney (MMLV) dans lequel la séquence codant pour la « green fluorescent

protein » (GFP) a été insérée. On procède à une tri-infection de par un plasmide d'emballage contenant les séquences « gag » et « pol », un plasmide contenant l'enveloppe VSVg, et un plasmide contenant la construction GFP selon un protocole bien connu par l'homme du métier.

5 On utilise des cellules de rat obtenues au passage 21 après l'extraction cellulaire. La température d'incubation est de 37°C sous atmosphère humide avec 20 % d'oxygène et 5 % de gaz carbonique. La densité cellulaire est de  $2.10^4$  cellules par boîtes de 35 mm. Le substrat utilisé est la gélatine.

10 Comme milieu de culture pour la phase de croissance, on utilise du milieu nutritif de base DME/F12 auquel on ajoute du sérum de veau fœtal à 20 % supplémenté par Dde l'insuline (10 µg/ml), de la dexaméthasone ( $5.10^{-5}$  M) et du FGF (10 ng/ml).

Le protocole d'infection est le suivant : le lendemain de l'ensemencement des cellules, on procède à l'infection des cellules avec le virus rMLV (VsVg) LTR-eGFP à une dose de  $8.3.10^6$  ip/mL. L'infection est réalisée en utilisant 10 particules infectieuses par cellule (MOI).

15 L'échantillon est dilué dans un volume final de 5 mL pour une boîte de 10 du milieu composé de :

- DMEM/F12
- polybrène (8 µg/ml) (molécule aidant à l'introduction de l'ADN dans la cellule)
- insuline (10 µg/ml)
- 20 - FGF (10 ng/ml).

Les cellules sont incubées pendant 6 heures à 37°C puis le milieu est remplacé par 10 mL de DME/F12 supplémenté par 20 % de FCS et de l'insuline (10 ng/ml), de la dexaméthasone ( $5.10^{-9}$  M) et du FGF2 (10 ng/ml).

25 Au 3<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> jour, on procède à l'observation des cellules vivantes par photographie microscopique avec un microscope à fluorescence. On dénombre les myoblastes ainsi que les myotubules, qui apparaissent verts et par conséquent qui ont été transfectés par le virus.

Comme attendu, les cellules non infectées ne révèlent aucune fluorescence et une très grande majorité des cellules expriment la GFP et ainsi apparaissent vertes, dans ces conditions plus de 90 % des cellules expriment la GFP. La GFP est correctement exprimée également 30 dans les myotubes qui résultent de la fusion des myoblastes. Dans ces conditions, les myoblastes, qui sont des cellules répliquatives, et les myotubes, qui sont des cellules différenciées, sont modifiables génétiquement et cette modification est stable. Le nombre de cellules exprimant la GFP n'est pas modifié par les passages en culture. Après réintroduction chez l'animal, les cellules ainsi modifiées expriment la GFP et peuvent ainsi être observées. 35 Cet outil est important pour analyser le devenir et la fonctions des cellules une fois réintroduites chez l'animal.

Exemple 8 :

*Amélioration des techniques de congélation cellulaire par utilisation de sérum humain en faible concentration.*

Les cellules utilisées proviennent d'un individu normal âgé de 16 ans. Elles sont mises en culture et récoltées au passage 7.

Au cours de la phase de culture, on utilise comme milieu 2 % de sérum humain (HS) supplémenté par de l'insuline 10 µg/ml, de l'acide ascorbique 0.252 mM, des facteurs de croissance FGF (10 ng/ml), PDGF (1 ng/ml), EGF (1 ng/ml), ainsi que de la thrombine (1 unité) et du LPA (5 mM).

On effectue le traitement enzymatique tel que dans l'exemple 1, en utilisant comme enzyme la trypsine-EDTA (laboratoire PAA). Le temps de traitement est de 10 minutes.

Une fois détachées de leurs substrats, les cellules sont mises dans les différents milieux de congélation qui sont les suivants à la concentration de  $10^5$  cellules par ml :

A une solution de DMSO à 10 % comme agent cryopréservant et du sérum foetal de veau (FCS) à 90 %, on ajoute du milieu DME/F12 seul ou supplémenté par :

- 90 % FCS
- 10 % FCS
- 10 % HS
- 2 % HS
- dexaméthasone à  $5.10^{-9}$  M
- insuline à 10 µg/ml
- acide ascorbique à 0.252 mM
- dexaméthasone + insuline + acide ascorbique (aux concentrations précédentes)
- 2 % HS + dexaméthasone à  $5.10^{-9}$  M
- 2 % HS + insuline à 10 µg/ml
- 2 % HS + acide ascorbique à 0.252 mM
- 2 % HS + dexaméthasone ( $5.10^{-9}$  M) + insuline (10 µg/ml) + acide ascorbique (0.252 mM).

Après 10 minutes à température ambiante, on refroidit progressivement les cellules jusqu'à la température de  $-80^{\circ}\text{C}$ .

La décongélation est effectuée dans un incubateur ou dans un bain-marie à  $37^{\circ}\text{C}$ . L'ampoule conservée dans l'azote liquide est placée dans un incubateur de culture. Après 5 minutes, les cellules décongelées sont placées dans un tube de centrifugation de 10 ml en présence de : DME/F12 supplémenté par du pyruvate, des antibiotiques comme la gentamycine et des facteurs protecteurs comme la L-carnitine à 1 mM, de l'insuline à 10 µg/ml, de la Dexaméthasone à  $5.10^{-9}$  M, de l'acide ascorbique à 0.252 mM. La centrifugation est effectuée à 200 g pendant 10 minutes à température ambiante. Les cellules

ainsi décongelées sont mise en cultures sur des multiples de 12 avec comme substrat de la gélatine et comme milieu de culture du sérum humain (HS) à 2 %HS supplémenté par de l'insuline (10  $\mu$ /ml), de l'acide ascorbique (0.252 mM), et des facteurs de croissance FGF2 (10 ng/ml), PDGF (1 ng/ml), et EGF (1 ng/ml), ainsi que de la thrombine (1unité) et du LPA (5 mM).

Après 2 jours de culture, on effectue un changement du milieu en utilisant des nouvelles boites à multi-puits. A cette étape, on réalise une coloration dans des boites à multi-puits sur une partie des cellules. L'autre partie est soumise à une nouvelle phase de culture pendant 4 jours supplémentaires et à un nouveau changement de milieu. On réalise une coloration 2 jours après.

Les résultats consignés dans le tableau 4 suivant :

Tableau 4

Effet du type de milieu de congélation sur la croissance cellulaire  
(exprimés en nombre de cellules/puits).

Type de milieu de congélation	Nombre de cellules/puits
DME/F12 seul	0
DME/F12 supplémenté par 90 % FCS	10.700
DME/F12 supplémenté par 10 % FCS	20.000
DME/F12 supplémenté par 10 % HS	18.750
DME/F12 supplémenté par 2 % HS	8.000
DME/F12 supplémenté par de la dexaméthasone ( $5.10^{-9}$ M)	0
DME/F12 supplémenté par de l'insuline (10 $\mu$ g/ml)	0
DME/F12 supplémenté par de l'acide ascorbique (0.252 mM)	0
DME/F12 supplémenté par de la dexaméthasone ( $5.10^{-9}$ M) + insuline (10 $\mu$ g/ml) +acide ascorbique (0.252 mM)	0
DME/F12 supplémenté par 2 % HS + dexaméthasone ( $5.10^{-9}$ M)	13.500
DME/F12 supplémenté par 2 % HS + insuline (10 $\mu$ g/ml)	15.000
DME/F12 supplémenté par 2 % HS + acide ascorbique (0.252 mM)	12.000
DME/F12 supplémenté par 2 % HS + dexaméthasone ( $5.10^{-9}$ M)+insuline (10 $\mu$ g/ml) + acide ascorbique (0.252 mM)	13.000

Ces résultats confirment que le milieu de congélation doit contenir du sérum ou des fractions de celui ci comme l'albumine pour une bonne conservation cellulaire Ils montrent également de façon surprenante que la présence des différents additifs comme l'insuline, la dexaméthasone et l'acide ascorbique permettent d'augmenter l'efficacité de congélation en présence de faible concentration de sérum, et notamment d'origine humaine. Par ces moyens, on montre qu'il est possible, en vue de préserver une bonne croissance cellulaire ultérieure,



d'optimiser le milieu de congélation en réduisant la concentration en sérum tout en s'émancipant des risques de contaminations par les prions et les virus d'origine animale.

5 Exemple 9 :

*Sélection et amplification de cellules musculaires progénitrices à partir de biopsies.*

10 Il est possible de sélectionner et d'amplifier les cellules musculaires progénitrices présentes dans les échantillons biologiques par des techniques de cultures. D'un point de vue cellulaire, une biopsie de tissu musculaire est très hétérogène. À la fois pour la thérapie cellulaire et pour l'exploitation pharmacologique et toxicologique cette hétérogénéité est un handicap.

15 La technique utilisée est basée sur la construction de techniques de culture qui dissocient la période de sélection de cellules musculaires progénitrices de la période d'amplification de celles-ci. Il est utilisé un milieu de sélection des cellules progénitrices et par la suite un milieu d'amplification.

20 Le milieu de sélection positif des cellules musculaires progénitrices combine à la fois des agents qui inhibent la croissance des cellules non musculaires et des agents qui stimulent la croissance des cellules progénitrices musculaires. Les premiers appartiennent à la famille des glucocorticoïdes et les seconds sont des antioxydants et des métaux. Dans cette phase de sélection, les cellules issues de la biopsie musculaire après digestion enzymatique sont cultivées à densité clonale en présence des agents inhibiteurs et des agents stimulateurs.

25

Le milieu d'amplification contient des facteurs de croissance qui permettent de faciliter la croissance des cellules sélectionnées. Ces facteurs appartiennent à la famille des FGF. Dans cette phase, les cellules peuvent être cultivées soit à faible densité soit à forte densité.

30

Le protocole décrit en deux étapes permet d'obtenir des populations de cellules musculaires enrichies à plus de 95 %.

35

Comme pour l'exemple 6 les cellules sontensemencées à densité clonale. Dans ce type d'essai, chaque cellule donne naissance à une colonie cellulaire dont le phénotype est analysé.

Les cellules proviennent d'une personne normale sans pathologie musculaire. Les cellules sontensemencées à densité clonale de 250 cellules par boîtes de 100mm dans 10ml de milieu de culture. Les milieux suivants sont utilisés pour la période de sélection J0:

- DMEM/F12 + FCS.
- DMEM/F12 + FCS + FGF.
- DMEM/F12 + FCS + Insuline + Dexamethasone + Sélénométhionine + Acide Ascorbique.
- 5 - DMEM/F12 + FCS + FGF + Insuline + Dexamethasone + Sélénométhionine + Acide Ascorbique.

Au jour 3 pour les quatre séries les milieux sont changés pour un milieu identique suivant :  
DMEM/F12 + FCS + FGF + Insuline + Dexamethasone.

- Le milieu est changé au jour 6 et jour 10 dans les quatre séries. Au jour 14 le milieu est  
10 changé pour un milieu permettant la différenciation des cellules musculaires composé de :
- DMEM/F12 + 1 % FCS + Fétuine + Insuline + EGF + T3.
  - Au jour 19 les cellules sont fixées et colorées comme décrit dans l'exemple 6.

Les résultats obtenus sont les suivants :

- 15
- Les cellules cultivées dans du FCS fournissent 70 colonies/boîte dont 10 % colonies myogéniques.
  - Les cellules cultivées dans du FCS + FGF fournissent 70 colonies/boîte dont 0 %  
20 colonies myogéniques.
  - Les cellules cultivées dans du FCS + Insuline + Dexamethasone + Sélénométhionine + Acide Ascorbique fournissent 150 colonies/boîte dont 100 % colonies myogéniques.
  - 25 - Les cellules cultivées dans du FCS + FGF + Insuline + Dexamethasone + Sélénométhionine + Acide Ascorbique fournissent 80 colonies/boîte dont 50 % colonies myogéniques.

La présence de la combinaison Insuline, Dexamethasone, Sélénométhionine et acide  
30 ascorbique permet de sélectionner avec une grande efficacité les cellules musculaires progénitrices.

Exemple 10 :

*Tests cellulaires prédictifs de toxicité musculaire*

5 Afin de construire des cultures de cellules permettant des tests toxicologiques *in vitro* nous avons utilisé les cellules musculaires et adipocytaires de rat pour analyser la spécificité de la toxicité musculaire.

Les conditions de l'expérience sont les suivantes :

10 L'origine des cellules et leur type sont: Rat (cellules musculaires) et Rat 160 mg (adipocytes). Leurs numéros de passage sont P9 et P4. Les conditions de culture sont FCS+FGF + Insuline + Dexamethasone.

Le traitement enzymatique est effectué avec de la Trypsine-EDTA (PAA), le temps de traitement étant 5 minutes.

15 Une Centrifugation est effectuée.

Les conditions de la manipulation sont les suivantes : type de boîte : 4 multipuits de 12 (TPP) ; substrat : Gélatine densité : 5 000 cellules/puit, le milieu de culture est DME/F12 + 20% FCS + FGF + Insuline +Dexamethasone + Statines (à des concentrations de 0 ; 0,1 ; 0,5 ou 1  $\mu$ M).

20 Les concentrations sont FGF : 10ng/ml ; Insuline : 10 $\mu$ g/ml, dexamethasone : 5.10<sup>-9</sup> M.

Les cellules sont ainsi cultivées 2 jours puis fixées colorées et analysées.

25 Cette analyse révèle une toxicité préférentielle de la Lovastatine pour les cellules musculaires. A 0.5 $\mu$ M, les cellules musculaires sont très inhibées dans leur croissance alors que les cellules adipocytaires y sont insensibles. La figure 3 montre les résultats de l'exploitation numérique des résultats du test de toxicité.

Ces expériences ont été reproduites avec des cellules musculaires humaines pour tester la toxicité des statines commerciales.

30

Les conditions de l'expérimentation sont les suivantes:

-le type de boîte est 2 multipuits de 96 (TPP)

-la densité cellulaire est 2 500 cellules/puit

35 -le milieu de culture contient DME/F12 + 20% FCS + FGF + Insuline + Dexamethasone +X.

X étant choisi parmi :

Lovastatine à une concentration de 0 ; 0,01 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,5  $\mu$ M ; ou

Cerivastatine à une concentration de 0 ; 0,01 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,5  $\mu\text{M}$  ; ou  
Atorvastatine à une concentration de 0 ; 0,01 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,5 ; 1  $\mu\text{M}$  ; ou  
Pravastatine à une concentration de 0 ; 0,01 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,5 ; 1  $\mu\text{M}$  ; ou  
Fluvastatine à une concentration de 0 ; 0,01 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,5 ; 1  $\mu\text{M}$  ; ou  
5 Simvastatine à une concentration de 0 ; 0,01 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,5 ; 1  $\mu\text{M}$ .

Le déroulement de l'expérimentation est comme suit.

10 Au jour 1 on procède à un changement des milieux. Au jour 3 on procède à une coloration.

Le temps de culture total est de 5 jours.

15 Après aspiration du milieu de culture, les cellules sont lavées avec du PBS puis fixées avec de l'éthanol à 100%. 10 minutes plus tard les cellules sont lavées à l'eau puis colorées avec une solution de Giemsa à 10% pendant 10 minutes. L'étape finale est un lavage à l'eau.

20 Des images des cellules sont obtenues avec un microscope inversé (Nikon) équipé d'une camera numérique et d'une platine motorisée.

L'exploitation numérique est présentée dans la Figure 4. Cette figure révèle la toxicité élevée de la Cérivastatine. Cette dernière molécule s'est avérée la statine la plus toxique en clinique humaine. Ce test permet donc de révéler la toxicité préférentielle de la Cérivastatine  
25 pour les cellules musculaires humaines.

## REVENDICATIONS

1. Composition de milieu de culture cellulaire contenant :
  - (i) du sérum et/ou de la fraction sérique d'origine humaine et/ou d'origine animale
  - (ii) de l'insuline ou un dérivé de celle-ci
  - (iii) un ou plusieurs composé(s) choisi(s) parmi la classe des antioxydants et/ou des vitamines.
2. Composition selon la revendication 1, dans laquelle on utilise du sérum humain.
3. Composition selon la revendication 1, dans laquelle on utilise du sérum bovin.
4. Composition selon la revendication 1, comprenant en outre un ou plusieurs composé(s) choisi(s) parmi la classe des facteurs de croissance de type FGF.
5. Composition selon la revendication précédente, dans laquelle la classe des facteurs de croissance de type FGF est composée de bFGF, FGF-2 à FGF-10.
6. Composition selon l'une des revendications précédentes, dans laquelle le dérivé de l'insuline est choisi parmi la classe des IGF, et des insulomimétiques de type vanadate.
7. Composition selon l'une quelconque des revendications 1-2 et 4-6, dans laquelle la concentration en sérum humain est inférieure à 5 % en volume, de préférence entre 1 % et 3 %.
8. Composition selon l'une des revendications précédentes, qui comprend en outre un glucocorticoïde.
9. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, ladite vitamine étant l'acide ascorbique.
10. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, ledit antioxydant étant la N-acétyl-cystéine et/ou le sélénium.
11. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, qui comprend en outre de l'acide lipophosphatidique et/ou un ou plusieurs composé(s) de la classes des EGF, hérégulines, thrombine, PDGF, hormones thyroïdiennes, LIF.

12. Procédé de culture de cellules progénitrices et/ou souches, dans lequel on utilise comme milieu de culture durant l'étape d'amplification cellulaire la composition selon l'une des revendications précédentes.

5 13. Procédé selon la revendication précédente, dans lequel on réalise une étape de différenciation cellulaire avant, pendant ou après ladite étape d'amplification cellulaire.

14. Procédé selon la revendication 12 ou 13, dans lequel le sérum humain utilisé est autologue des cellules progénitrices/souches.

10 15. Procédé de production de myoblastes par mise en œuvre du procédé selon l'une des revendications 12 à 14.

15 16. Procédé de production de myoblastes selon la revendication précédente, dans lequel les cellules progénitrices et/ou souches sont obtenues par une étape d'extraction cellulaire de tissus musculaires.

17. Procédé de production de myoblastes selon la revendication précédente, ladite étape d'extraction étant réalisée par digestion enzymatique.

20 18. Procédé de production de myoblastes selon l'une des revendications 15 à 17, dans lequel on effectue une récolte et une séparation des cellules obtenues.

25 19. Procédé de production de myoblastes selon la revendication précédente, dans lequel ladite étape de récolte et séparation des cellules est effectuée par digestion enzymatique suivie d'une centrifugation et/ou filtration.

30 20. Procédé de production de myoblastes selon l'une des revendications 15 à 19, dans lequel on réalise un test de fonctionnalité sur l'aptitude des myoblastes à former des colonies.

21. Procédé de production de myoblastes selon l'une des revendications 15 à 20 dans lequel on réalise en outre une étape de caractérisation.

35 22. Procédé de production de myoblastes selon la revendication précédente, dans lequel on utilise des marqueurs du cycle cellulaire.

23. Procédé de production de myoblastes selon l'une des revendications 15 à 22, dans lequel on réalise une étape de congélation des myoblastes.

24. Population cellulaire contenant des cellules progénitrices et/ou souches et/ou des myoblastes dans le milieu de culture selon l'une des revendications 1 à 11.

5        25. Utilisation des myoblastes selon l'une des revendications 15 à 23, ledit produit étant destiné à la thérapie cellulaire.

26. Utilisation des myoblastes selon la revendication précédente pour la préparation d'un produit destiné au traitement fonctionnel des petits muscles.

10

27. Utilisation des myoblastes selon la revendication 25 pour la préparation d'un produit destiné au traitement de l'incontinence urinaire.

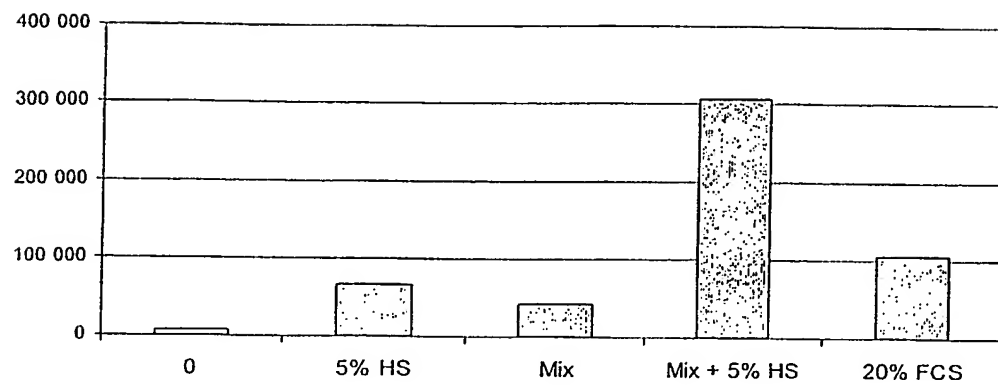
15        28. Utilisation des myoblastes selon l'une des revendications 15 à 23, ledit produit étant destiné à la thérapie génique.

29. Utilisation des myoblastes par le procédé obtenus selon l'une des revendications 15 à 23 dans le criblage toxicologique et/ou pharmacologique.

20        30. Utilisation des myoblastes selon la revendication précédente pour détecter une ou plusieurs substance(s) impliquée(s) dans la rhabdomyolyse.

1/5

FIGURE 1



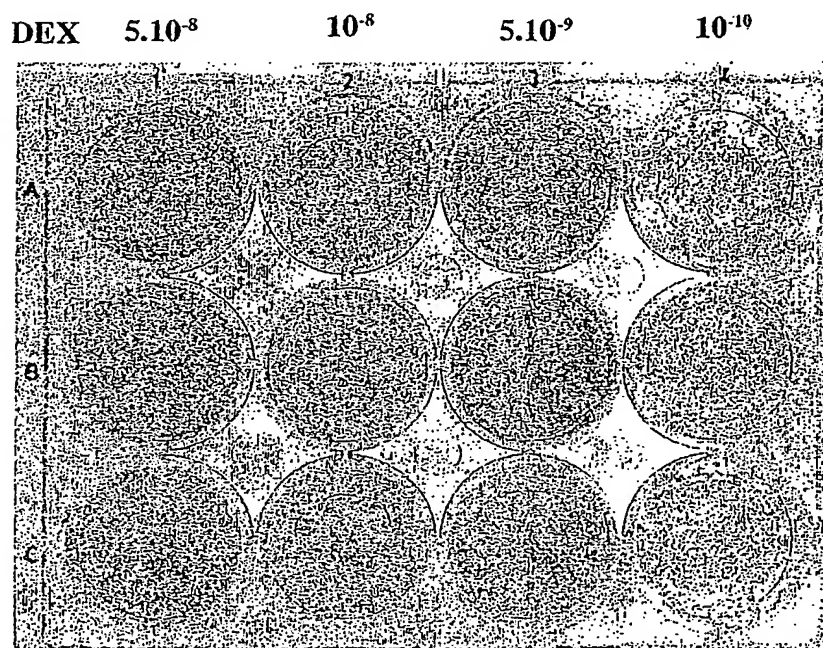
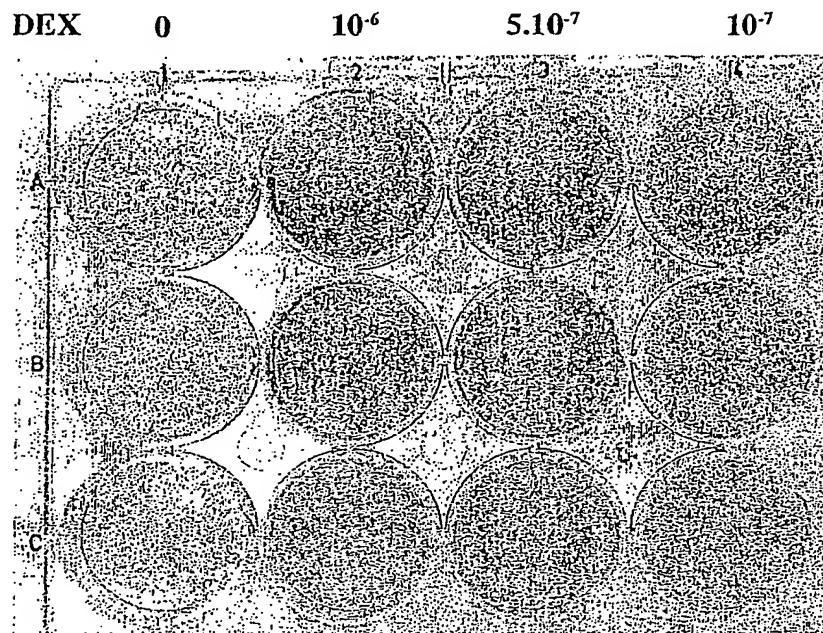


2/5

FIGURE 2A

Etude de l'effet de la dose de dexaméthasone ajoutée à un milieu de culture sur la prolifération de cellules.

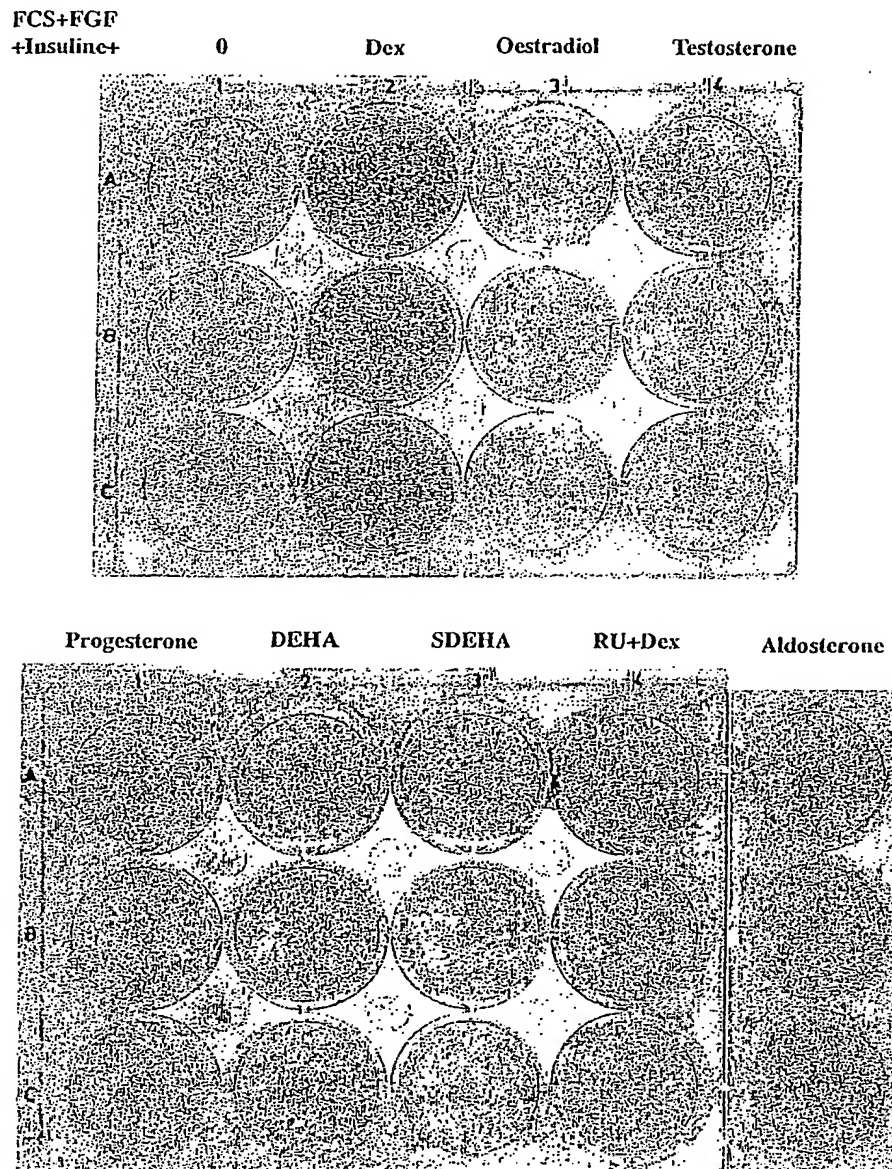
**RAT P23 Dose/Réponse de la Dex  
FCS+FGF+Insuline**



3/5

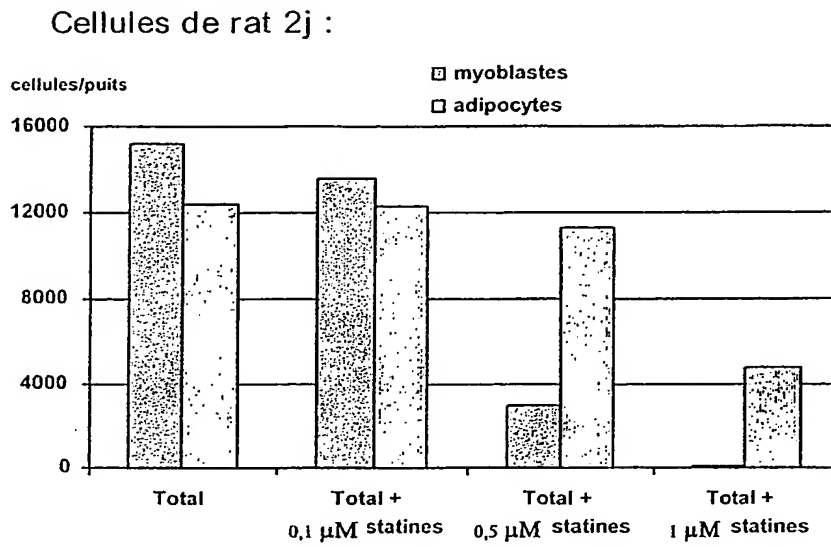
FIGURE 2B

Etude de la spécificité de la dexaméthasone

RAT P27 Specificite de la Dex à  $10^{-7}$ 

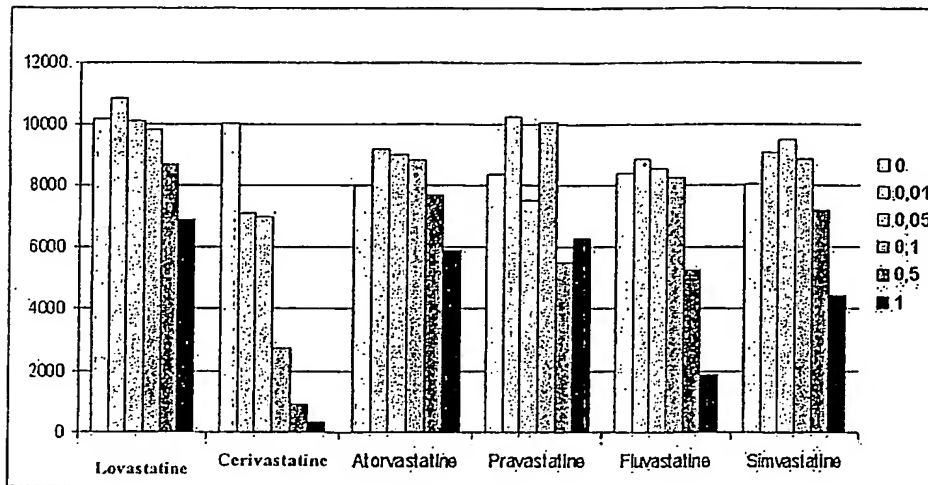
4/5

FIGURE 3 Toxicité des Statines sur des cultures de cellules de rat



5/5

FIGURE 4 Toxicité des Statines sur des cultures de cellules humaines



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 03/03691

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C12N5/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
------------	--	-----------------------

X	PINSET C ET AL: "CONTROL OF MYOGENESIS IN THE MOUSE MYOGENIC C2 CELL LINE BY MEDIUM COMPOSITION AND BY INSULIN CHARACTERIZATION OF PERMISSIVE AND INDUCIBLE C2 MYOBLASTS" DIFFERENTIATION, vol. 38, no. 1, 1988, pages 28-34, XP002247432 ISSN: 0301-4681 figure 3; table 1 --- -/--	1-3, 12-24
---	--	---------------

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 April 2004

Date of mailing of the international search report

28/05/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Trommsdorff, M

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/03691

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>UPTON STEVE J ET AL: "Effects of select medium supplements on in vitro development of Cryptosporidium parvum in HCT-8 cells." JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 33, no. 2, 1995, pages 371-375, XP001153442  ISSN: 0095-1137  page 373, left-hand column</p>	1-3
Y	<p>US 2001/039050 A1 (ERLACHER LUDWIG ET AL)  8 November 2001 (2001-11-08)  paragraphs '0017!-'0024!; table 1</p>	1-14,24
Y	<p>BETIGER W J ET AL: "RAPID CLONAL GROWTH AND SERIAL PASSAGE OF HUMAN DIPLOID FIBROBLAST IN A LIPID-ENRICHED SYNTHETIC MEDIUM SUPPLEMENTED WITH EPIDERMAL GROWTH FACTOR, INSULIN, AND DEXAMETHASONE" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 78, no. 9, 1 September 1981 (1981-09-01), pages 5588-5592, XP000606304  ISSN: 0027-8424  abstract; tables 1,2</p>	1-14,24
A	<p>JIN P ET AL: "RECOMBINANT PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR-BB STIMULATES GROWTH AND INHIBITS DIFFERENT OF RAT L6 MYOBLASTS" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 266, no. 2, 1991, pages 1245-1249, XP002247434  ISSN: 0021-9258  the whole document</p>	

## Continuation of Box I.1

Although claims 29 and 30 relate to a diagnostic method practised on the human or animal body, the search was carried out and was based on the stated effects of the compound or composition.

Although claims 25 and 28 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the stated effects of the compound or composition.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/03691

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2001039050 A1	08-11-2001	AU 7984498 A WO 9859035 A2	04-01-1999 30-12-1998

---



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De  de Internationale No

PCT/FR 03/03691

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>UPTON STEVE J ET AL: "Effects of select medium supplements on in vitro development of Cryptosporidium parvum in HCT-8 cells." JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 33, no. 2, 1995, pages 371-375, XP001153442 ISSN: 0095-1137 page 373, colonne de gauche</p>	1-3
Y	<p>US 2001/039050 A1 (ERLACHER LUDWIG ET AL) 8 novembre 2001 (2001-11-08) alinéas '0017!-'0024!; tableau 1</p>	1-14,24
Y	<p>BETIGER W J ET AL: "RAPID CLONAL GROWTH AND SERIAL PASSAGE OF HUMAN DIPLOID FIBROBLAST IN A LIPID-ENRICHED SYNTHETIC MEDIUM SUPPLEMENTED WITH EPIDERMAL GROWTH FACTOR, INSULIN, AND DEXAMETHASONE" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 78, no. 9, 1 septembre 1981 (1981-09-01), pages 5588-5592, XP000606304 ISSN: 0027-8424 abrégé; tableaux 1,2</p>	1-14,24
A	<p>JIN P ET AL: "RECOMBINANT PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR-BB STIMULATES GROWTH AND INHIBITS DIFFERENT OF RAT L6 MYOBLASTS" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 266, no. 2, 1991, pages 1245-1249, XP002247434 ISSN: 0021-9258 le document en entier</p>	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Document de Internationale No

PCT/FR 03/03691

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 C12N5/06

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	PINSET C ET AL: "CONTROL OF MYOGENESIS IN THE MOUSE MYOGENIC C2 CELL LINE BY MEDIUM COMPOSITION AND BY INSULIN CHARACTERIZATION OF PERMISSIVE AND INDUCIBLE C2 MYOBLASTS" DIFFERENTIATION, vol. 38, no. 1, 1988, pages 28-34, XP002247432 ISSN: 0301-4681 figure 3; tableau 1 --- --/--	1-3, 12-24

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

19 avril 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

28/05/2004

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Trommsdorff, M

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre I.1

- . Bien que les revendications 29 et 30 concernent une méthode de diagnostic appliquée au corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés au produit/à la composition.
- . Bien que les revendications 25 et 28 concernent une méthode de traitement du corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés au produit/à la composition.

**Cadre I Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)**

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☒ Les revendications n<sup>os</sup>  
se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:  
voir feuille supplémentaire SUITE DES RENSEIGNEMENTS PCT/ISA/210
2. ☐ Les revendications n<sup>os</sup>  
se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n<sup>os</sup>  
sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

**Cadre II Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)**

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n<sup>os</sup>
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n<sup>os</sup>

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

Document brevet cité  
au rapport de recherche

Date de  
publication

Membre(s) de la  
famille de brevet(s)

Date de  
publication

US 2001039050

A1

08-11-2001

AU

7984498 A

04-01-1999

WO

9859035 A2

30-12-1998

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**